

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

Rodolfo Marinho

Efeito do treinamento físico sobre a proteína TRB3 e seu  
papel em restaurar a sensibilidade à insulina em tecido  
hepático de camundongos diabéticos

**SANTOS**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**Rodolfo Marinho**

**Efeito do treinamento físico sobre a proteína TRB3 e seu  
papel em restaurar a sensibilidade à insulina em tecido  
hepático de camundongos diabéticos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo como parte dos  
requisitos para obtenção do título de bacharel em  
Educação Física – modalidade saúde.

**Orientador:** Prof. José Rodrigo Pauli

**SANTOS**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre me motivou e incentivou ao longo da vida para enfrentar as dificuldades e nunca se deixar abater, principalmente, nestes últimos quatro anos.

Aos meus colegas de classe, por todos os momentos especiais que passamos e por me ajudarem nesta etapa de desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos professores da Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista, por todo esforço e dedicação para um ensino superior de qualidade. E especialmente, ao meu orientador, Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, pela paciência, compreensão e apoio, possibilitando-me um grande desenvolvimento acadêmico.

## RESUMO

A TRB3 (*a mammalian homolog of Drosophila Tribbles*) surge como uma importante proteína de ação negativa sobre a via de sinalização da insulina. Esta proteína pode interagir e inibir a atividade da Akt, uma serina/treonina quinase que tem papel central na sinalização da insulina. Em contrapartida, o exercício físico tem mostrado grande capacidade na melhora da hiperglicemia e melhora na sensibilidade à insulina. Entretanto, os mecanismos moleculares pelo qual o exercício físico melhora a homeostase glicêmica, com efeito, principalmente no tecido hepático, ainda estão parcialmente conhecidos. Este estudo demonstrou que 8 semanas de treinamento físico, em camundongos Swiss diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica, foi capaz de aumentar a captação de glicose até 24h após a última sessão de exercício, diminuir a massa corporal, a gordura epididimal, a glicemia e a insulinemia de jejum. Além de aumentar a fosforilação da Akt e da FoxO1, diminuir a expressão da TRB3 e de sua associação com a Akt. Por fim, verifica-se que este reduziu a expressão das enzimas gliconeogênicas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) no fígado. Assim, estes resultados mostram alguns dos mecanismos moleculares pelo qual o exercício físico crônico consegue restaurar a homeostase glicêmica, melhorar a sinalização da insulina no fígado de camundongos diabéticos. Diante desses achados pode-se sugerir a utilização do treinamento físico como prevenção e tratamento da diabetes.

## PALAVRAS-CHAVE

Treinamento físico; Resistência à Insulina; Obesidade e Diabetes.

## ABSTRACT

TRB3 (*a mammalian homolog of Drosophila Tribbles*) is emerging as an important protein play negative action in the regulation of insulin signaling pathway. This protein can directly bind and inhibit to Ser/Thr protein kinase Akt, the major downstream kinase of insulin signaling. Conversely, physical exercise has been linked to improved glucose homeostasis and enhanced insulin sensitivity. However, the molecular mechanisms by which exercise improves glucose homeostasis, particularly in the hepatic tissue, are only partially known. This study demonstrate that 8 weeks of physical training, in swiss diabetic mice induced by high fat diet, improves the glucose uptake after 24h of the last exercise session, reduced body weight, epididymal fat, fasting glucose and fasting insulin. Besides increasing the Akt serine and FoxO1 phosphorylation, reducing TRB3 expression and your association with Akt serine (Akt/TRB3 association) and decrease the hepatic expression of gluconeogenic enzymes phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase). Thus, these results provide new insights into the mechanism by which chronic physical exercise improves glucose homeostasis in the liver. And, therefore, confirm the important role of the physical training as treatment of diabetes.

## KEY-WORDS

Physical training; Insulin resistance; Obesity and Diabetes

## SUMÁRIO

<b>Introdução.....</b>	<b>p.01</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>p.07</b>
<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>p.07</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>p.11</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>p.17</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>p.20</b>
<b>Referências.....</b>	<b>p.21</b>

## INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos. Uma pequena parcela de pacientes apresenta diabetes mellitus do tipo 1, que é causado por falência da célula beta e se traduz por deficiência absoluta de insulina (ATKINSON, EISENBARTH, 2001). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais freqüente da doença, com um marcante aumento em sociedades industrializadas (HOSSAIN, KAWAR, EL NAHAS, 2007).

Infelizmente, as especulações não são animadoras para essa realidade humana. Com a manutenção ou progressiva acentuação deste estilo de vida que não é dotado de atividade física e alimentação saudável, o prognóstico é de aumento das taxas de prevalência da DM2, que acompanha a crescente aceleração do número de indivíduos obesos do planeta, num fenômeno chamado “diabesidade”. Aproximadamente 90% dos DM2 apresentam excesso de gordura corporal. Vale lembrar, que 197 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam intolerância à glicose, comportamento metabólico que antecede o desenvolvimento do diabete. O diagnóstico para o futuro próximo é de aumento do número de casos e a incidência deve ser de 420 milhões até 2025. Este aumento pronunciado da incidência de diabetes deve acontecer também em crianças e adolescentes, onerando ainda mais os gastos com a saúde pública (HOSSAIN, KAWAR, EL NAHAS, 2007).

A associação entre obesidade e diabetes foi bem estabelecida há décadas, e a maior prova para esta associação esta na capacidade do tecido adiposo em causar resistência à insulina (XU, BARNES, YANG, et al, 2003). A insulino resistência representa fundamental aspecto na etiologia do DM2 e no desenvolvimento de outras doenças incluindo hipertensão, hiperlipidemia, aterosclerose, esteatose hepática não alcoólica, ovário policístico e alguns tipos de câncer.

O fígado é considerado um órgão fundamental no processo hiperglicêmico do diabético tipo 2. A resistência à insulina no tecido hepático tem implicações importantes na produção de nova glicose e conseqüentemente no aumento da concentração desta hexose no sangue. No entanto, para que possamos compreender a importância do efeito da

insulina sobre a produção hepática de glicose se faz necessário inicialmente entender os aspectos moleculares envolvidos na resistência à insulina no fígado na obesidade.

### **Resistência à insulina e produção hepática de glicose**

No fígado, a resistência à insulina leva ao aumento da produção hepática de glicose. A produção hepática de glicose é a maior fonte endógena deste substrato, durante o jejum, representa noventa por cento do total de glicose liberada (NEVADO, VALVERDE, BENITO, 2006; SHAO, QIAO, JANSSEN et al, 2005). Esse mecanismo é essencial para a manutenção da homeostase da glicose no jejum prolongado (SHE, SHIOTA, SHELTON et al, 2000). Dessa forma, a sinalização hepática da insulina possui um papel central no equilíbrio do metabolismo dos carboidratos e dos lipídios (MATSUMOTO, HAN, KITAMURA et al, 2006), uma vez que o fígado possui grande habilidade de produzir glicose durante o jejum e remover glicose da circulação durante o período pós-prandial (NEVADO, VALVERDE, BENITO, 2006; SHAO, QIAO, JANSSEN et al, 2005 ; SHE, SHIOTA, SHELTON et al, 2000).

A resistência hepática à insulina culmina com maior produção hepática de glicose. Esta diminuída sensibilidade hepática à insulina leva a hiperglicemia pós-prandial, já que a gliconeogênese hepática mantém-se estimulada (TANIGUCHI, EMANUELLI, KAHN, 2006). Cronicamente, o estado de resistência hepática à insulina, somando-se a incapacidade das células beta pancreáticas em manter uma adequada secreção de insulina leva a instalação do Diabetes tipo 2 (DM2) (ZIMMET, 2000). Além disso, estudos verificaram que no fígado de ratos diabéticos existe um aumento na produção de glicose e uma diminuição da produção de glicogênio e da captação de glicose (ASHMORE, HASTINGS, NESBETT, 1954).

Em indivíduos diabéticos, verifica-se que a hiperglicemia e hiperinsulinemia pós-prandial não são capazes de inibir a produção hepática de glicose e estimular a captação pelo fígado conduzindo à hiperglicemia de jejum verificada no DM2 (SHAO, QIAO, JANSSEN et al, 2005; ALTAMONTE, RICHTER, HARBARAN et al, 2003; ROGNSTAD, 1996). Dentre os

mecanismos moleculares envolvidos no controle da síntese de nova glicose destaca-se a proteína distal da via da insulina, denominada Akt.

A Akt é uma serina treonina quinase que possui três isoformas (Akt1, Akt2 e Akt3) todas expressas em tecido muscular. Animais deficientes de Akt (nocaute da Akt) demonstraram características de diabetes severa, tais como hipertrofia das células betas, aumento na produção hepática de glicose, diminuída homeostase da glicose e exacerbada hiperglicemia. A proteína Akt tem a habilidade de fosforilar e ativar vários alvos metabólicos. A Akt estimula captação de glicose, síntese de glicogênio e de proteínas. Além disso, a Akt possui outras funções não metabólicas, tais como a inibição de apoptose e degradação protéica em músculo esquelético (PUIGSERVER, RHEE, DONOVAN et al, 2003).

Experimentos genéticos no verme *C. elegans* identificaram um fator de transcrição da família *forkhead* denominado Daf16, como um efetor chave da sinalização de insulina. O ortólogo do Daf16 em mamíferos é um fator de transcrição conhecido por FoxO (*Forkhead box-containing gene, O subfamily*) e este tem ação negativa sobre a sinalização de insulina. As proteínas FoxO são substratos da Akt *in vivo*. Este fator de transcrição é fosforilado pela Akt em três resíduos de serina e treonina: Thr24, Ser256 e Ser319. A fosforilação desses três sítios da FoxO resulta em sua extrusão nuclear e sua conseqüente inativação (BRUNET, BONNI, ZIGMOND et al, 1999; BARTHEL, SCHMOLL, KRÜGER et al, 2001). Técnicas como o Gel Shift mostrou que a FoxO1 se liga a seqüência responsiva à insulina no promotor da glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (HALL, YAMASAKI, KUCERA et al, 2000) e a superexpressão da FoxO1 marcadamente aumenta a expressão endógena da G-6-Pase. Além disso, em ratos nocautes, observou-se que a FoxO1 controla a homeostase da glicose e da gliconeogênese hepática através da via da insulina (NAKAE, KITAMURA, SILVER et al, 2001). Haploinsuficiência da FoxO1 correlaciona com níveis normais de glicose e de insulina sanguínea em modelo de camundongos resistentes à insulina, isto se deve em parte a melhora na sensibilidade à insulina, que em última instância, leva a diminuição da G-6-Pase e PEPCK. Por último, a superexpressão do mutante FoxO1 constitutivamente ativo, no qual a FoxO1 não é ativada pela



Akt, ocorre aumento da expressão da G-6-Pase e PEPCK e aumento nas concentrações de glicose sanguínea em jejum (NAKAE, KITAMURA, SILVER et al, 2001).

A produção hepática de glicose em mamíferos envolve um número de reações enzimáticas. Na via da gliconeogênese, a PEPCK é altamente expressa no fígado e é uma das enzimas mais importantes (HANSON, GARBER, 1972; SHE, BURGESS, SHIOTA et al, 2003). Diversos fatores mostram-se importantes para a transcrição e ativação de PEPCK no fígado, alguns estimulantes, como FoxO1, glucagon e glicocorticóides, e outro inibitório, como a insulina, sendo o papel da insulina dominante (SHAO, QIAO, JANSSEN et al, 2005 ; MIYAKE, OGAWA, MATSUMOTO et al, 2002; O'BRIEN, NOISIN, SUWANICHKUL et al, 1995). Durante um jejum prolongado, onde os estoques de glicogênio estão exauridos, a PEPCK tem um papel essencial em converter oxalacetato em fosfoenolpiruvato. No jejum, a atividade desta enzima aumenta de três a cinco vezes no fígado (HANSON, GARBER, 1972; SHE, BURGESS, SHIOTA et al, 2003). Em animais nocaute da PEPCK verifica-se uma diminuição de quarenta por cento na produção hepática de glicose e de trinta e três por cento da ativação da G-6-Pase (SHE, BURGESS, SHIOTA et al, 2003).

Outra enzima gliconeogênica importante no processo de hiperglicemia em indivíduos obesos com resistência à insulina é a G-6-Pase, uma das enzimas responsáveis pela produção hepática de glicose, através da conversão da glicose-6-fosfato em glicose (CORI e CORI, 1952; DANIELE, RAJAS, PAYRASTRE et al, 1999). O jejum aumenta a concentração e a atividade da G-6-Pase, mas a ação da insulina, no período pós-prandial, faz com que esses níveis se normalizem (ASHMORE, HASTINGS, NESBETT, 1954; DANIELE, RAJAS, PAYRASTRE et al, 1999). Quando a ação da insulina está prejudicada, como na resistência à insulina e no DM2, a atividade desta enzima encontra-se aumentada no fígado, levando a uma elevação da síntese de glicose (CLORE, STILLMAN, SUGERMAN, 2000). Esta elevação na função da G-6-Pase pode ser devido ao aumento nos níveis enzimáticos, ou pela alteração do potencial catalítico ou pela combinação dos dois (BAND, POSNER, 1997).

Estudos na literatura com modelos experimentais em que há defeito na ação da insulina observam-se descontrole da atividade da PEPCK e G-6-Pase e conseqüente desregulação da produção hepática de glicose (NEVADO, VALVERDE, BENITO, 2006; TANIGUCHI, EMANUELLI, KAHN, 2006; MIYAKE, OGAWA, MATSUMOTO et al, 2002; BAND, POSNER, 1997; UEKI, YAMAMOTO-HONDA, KABURAGI et al, 1998).

Conforme descrito anteriormente, a Akt é uma serina treonina quinase que é principalmente ativada pela insulina no fígado e no músculo esquelético (SHEPHERD, WITHERS, SIDDLE, 1998). Este papel fisiológico da Akt inclui seu envolvimento no metabolismo dos nutrientes, crescimento celular, regulação transcricional, regulação e sobrevivência celular e função central na via de sinalização da insulina (CHEN, KIM, YANG et al, 2001; DOWNWARD, 1998; FAYARD, TINTIGNAC, BAUDRY et al, 2005 ; SONG, OUYANG, BAO, 2005).

A expressão total de Akt não é afetada pelo jejum nem pela re-alimentação, já a fosforilação da mesma sofre uma regulação positiva durante uma re-alimentação e uma regulação negativa quando a ação da insulina está diminuída, como no jejum ou em uma falha na via de sinalização (BOUDEWIJN, MEDEMA, 2003; NAKASHIMA, YAKABE, YAMAZAKI et al, 2006). Várias moléculas inibitórias agem sobre e afetam a ação da Akt, como a TRB3 (*a mammalian homolog of Drosophila Tribbles*), podendo levar a resistência à insulina.

### **Papel da TRB3 no controle da produção hepática de glicose**

A TRB3 pertence a uma nova família de proteínas constituída de três membros (TRB1, TRB2 e TRB3) e que estão associadas a numerosas proteínas incluindo fatores de transcrição, proteínas quinases como também a Ubiquitina E3 ligase. Por interagir com fatores diferentes as TRBs regulam um grande número de processos biológicos incluindo crescimento celular, diferenciação e metabolismo. A TRB1 interage com a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) modulando sua atividade quinase implicando na proliferação de células musculares (SUNG, GUAN, CZIBULA et al, 2007; TANG, ZHONG, SHANG et al, 2008). A TRB2 interage com os fatores de transcrição C/EBP e por isso está implicada na diferenciação dos adipócitos

(NAIKI, SAIJOU, MIYAOKA et al, 2007). A isoforma TRB3 surge como um importante alvo de estudos por desempenhar um papel de destaque na regulação do sinal da insulina através da inibição da fosforilação da quinase Akt (MATSUMOTO, HAN, KITAMURA et al, 2006; LYNEDJIAN, 2005; DU, HERZIG et al, 2003). O polimorfismo humano da TRB3 (Q84R) leva a marcante inibição da atividade da Akt e está relacionado à resistência à insulina e aumentado risco cardiovascular (PRUDENTE, HRIBAL, FLEX et al, 2005).

No fígado a expressão de TRB3 é induzida durante o jejum com o objetivo de reduzir o sinal da insulina em um momento no qual a oferta de nutrientes não é abundante, evitando que o organismo alcance um estado de hipoglicemia (MATSUMOTO, HAN, KITAMURA et al, 2006; LYNEDJIAN, 2005; DU, HERZIG et al, 2003). Após refeição, quando os níveis circulantes de insulina estão aumentados, verifica-se redução de cinquenta por cento na expressão de TRB3 (MATSUSHIMA, HARADA, WEBSTER et al, 2006). Níveis protéicos elevados de TRB3 e maior associação de TRB3 e Akt podem estar relacionados à resistência à insulina e conseqüentemente, a diabetes (LYNEDJIAN, 2005; DU, HERZIG et al, 2003; MATSUSHIMA, HARADA, WEBSTER et al, 2006). No fígado diabético, a expressão da TRB3 está aumentada independente do excesso de nutrientes ou hiperinsulinemia levando a defeito na síntese de glicogênio mediada pela insulina, conduzindo à hiperglicemia (MATSUMOTO, HAN, KITAMURA et al, 2006; LYNEDJIAN, 2005; DU, HERZIG et al, 2003), demonstrando sua atividade em inibir a fosforilação da Akt e impedindo as atividades estimuladas pela insulina, como o efeito inibitório na produção hepática de glicose e a inativação de fatores e transcrição como a FoxO1 (DU, HERZIG et al, 2003; MATSUSHIMA, HARADA, WEBSTER et al, 2006). Em sentido contrário, uma inibição na atividade da TRB3 eleva a fosforilação de Akt em resposta à insulina no fígado (DU, HERZIG et al, 2003; MATSUSHIMA, HARADA, WEBSTER et al, 2006). No entanto, poucos estudos até o momento têm investigado os efeitos do exercício físico sobre a expressão da TRB3, tanto em animais, quanto em humanos com diabetes. Tais considerações sinalizam a importância em investigar o efeito do treinamento físico sobre a proteína TRB3 e seu papel em restaurar a sensibilidade à insulina em tecido hepático evitando a

hiperglicemia decorrente da produção excessiva de glicose pelo fígado no diabetes. Apesar da necessidade de se definirem muitas outras etapas da ação do exercício em vias de sinalização intracelular, todas estas descobertas abrem novas perspectivas para compreensão do efeito do exercício sobre a captação de glicose.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Estudar o efeito do treinamento físico sobre a proteína TRB3 e seu papel em restaurar a sensibilidade à insulina em tecido hepático de camundongos diabéticos.

### **Específicos**

- a) Avaliar a sensibilidade à insulina através do teste de tolerância à insulina.
- b) Avaliar a expressão e fosforilação da Akt no tecido hepático dos animais.
- c) Avaliar o efeito do treinamento físico sobre a proteína TRB3 e da associação TRB3/Akt no fígado e conseqüentemente a fosforilação da FoxO1.
- d) Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a expressão da PEPCK e G-6-Pase no fígado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Caracterização dos animais**

Foram utilizados vinte e quatro (n=24) camundongos Swiss com seis semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina - UNESC, Criciúma - SC. Os animais foram alocados, na mesma instituição, em gaiolas individuais e receberam água e dois tipos de dieta: ração padrão para roedores (C) ou dieta hiperlipídica (DHL) durante o período experimental, *ad libitum* (detalhes da dieta, ver referência PAULI et al, 2008). Os camundongos foram expostos a ciclos de 12 horas claro e 12

horas escuro e mantidos a temperatura de 20°C e 22°C. Inicialmente um grupo de animais (n=6) recebeu dieta padrão e outro grupo de animais (n=18) recebeu DHL por 12 semanas. Para confirmar a indução do diabetes pela DHL foram realizadas coletas de sangue através da cauda do animal para averiguar os valores de glicemia após jejum de 8 horas. O diagnóstico foi dado pelo valor de glicose mensurado em aparelho Glicosímetro (modelo Accu-Chek Advantage, Roche - Mannheim, Germany). Sendo considerados diabéticos os camundongos com glicemia superior a 180 mg/dl. Em seguida, os animais foram distribuídos em três grupos, a saber: Grupo 1, seis camundongos controles (n=6) permaneceram em dieta padrão (8 semanas), e foram colocados em água rasa (a nível do tórax) duas vezes por semana para simular o estresse do meio líquido dos demais grupos (C). Grupo 2: seis camundongos sedentários (n=6) permaneceram em DHL por 8 semanas (S-DHL) e também foram colocados em meio líquido conforme previamente descrito. Grupo 3: Doze camundongos (n=12) permaneceram em dieta hiperlipídica por 8 semanas e foram submetidos a um protocolo de treinamento físico de natação no mesmo período (T-DHL). Todos os experimentos a seguir relatados foram realizados no laboratório de fisiologia e bioquímica, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, em Criciúma/SC. Para acompanhamento dos estágios de treinamento e aprendizado das técnicas utilizadas a seguir descritas, foram feitas visitas ao laboratório de sinalização celular situado na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp - Campinas. Além disso, as amostras do fígado foram utilizadas e processadas como descritas no material e método no mesmo laboratório de sinalização celular previamente descrito.

### **Programa de treinamento físico**

O protocolo de exercício físico consistiu de natação, em grupos de seis animais, e foi realizado em tanques cilíndricos de diâmetro interno de 60 cm e 100 cm de profundidade, com temperatura da água em  $34 \pm 1$  °C. Os animais realizaram sessões de exercício de 1 hora, cinco vezes por semana, com sobrecarga adicional equivalente a 5% do peso corporal do animal na semana, presa a cauda. O treinamento físico teve duração de oito semanas.

### **Avaliação de parâmetros metabólicos**

Os animais foram avaliados quanto à massa corporal, níveis séricos de glicose e insulina no final do período experimental. Cinco animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização de teste de tolerância à insulina uma semana antes do final do experimento.

### **Determinação da glicose e insulina**

A dosagem da glicose plasmática foi realizada através do método enzimático colorimétrico de glicose oxidase. A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada pelo método ELISA.

### **Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTlip)**

O teste foi realizado 16, 24, 36 e 48 horas após a última sessão de treino de natação. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivalerá ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (2U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do decremento da glicose (Kitt) foi calculada usando a formula  $0,693/t_{1/2}$ . O  $t_{1/2}$  da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. A partir dos resultados deste teste, foi determinado o melhor tempo de extração dos tecidos para avaliação das proteínas de interesse. A sensibilidade à insulina foi realizada respeitando um intervalo de 48 horas entre cada TTlip. O grupo T-DHL foi dividido em dois grupos de seis animais, sendo um grupo avaliado no TTlip após 16 e 24 horas (n=6) e outro grupo (n=6) avaliado após 36 e 48 horas da última sessão de esforço físico.

### **Extração do fígado e tecido adiposo**

Os camundongos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg). A perda dos reflexos pedal e da córnea foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi

aberta, e após localização da veia porta 0,2 ml de salina ou insulina ( $10^{-6}$  mol/l) foram injetadas. Amostras do fígado foram retiradas após 30 s da injeção de insulina, e foram homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoprecipitação com anticorpo específico. Ao final dos procedimentos experimentais o tecido adiposo epididimal e perirenal foi retirado para pesagem em balança analítica.

### **Imunoprecipitação**

Após determinação da concentração das proteínas foram realizadas a imunoprecipitação com anticorpos específicos. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6 MB por 2 horas à 4°C e decantados por centrifugação por 20 minutos à 4°C/11000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas (imunocomplexos).

### **Imunoblot**

Os imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT. Após rápida fervura foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com anticorpo específico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó

desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O método de identificação utilizado foi a quimioluminescência que consiste de: as proteínas são transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad, Hercules/CA, USA), onde as proteínas de interesse são detectadas incubando-se as membranas com anticorpos primários, seguindo-se a exposição com anticorpos secundários conjugados com a horseradish peroxidase (HRP). As bandas imunorreativas são detectadas por quimioluminescência e a densitometria determinada por meio de sistema de captação e análise de imagem.

### **Anticorpos**

Os anticorpos utilizados para imunoprecipitação foram TRB3 e Akt. Os anticorpos utilizados para o imunoblot foram anti-Akt, anti-phosphoserina Akt (Ser473), anti-FoxO1, anti-TRB3, anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-PEPCK, anti-G-6-Pase, anti-phospho-Foxo1 (Cell Signaling Technology, MA).

### **Análise estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Quando comparado dois grupos, foi utilizado teste t de Student para dados não pareados. Quando necessário utilizou-se análise de variância, seguida do teste post hoc de Bonferroni para comparação múltipla de médias, sendo adotado o nível de significância  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### *Teste de Tolerância à Insulina (TTI) tempo dependente*

Os resultados obtidos no TTI realizado de forma tempo-dependente mostram que os animais S-DHL tiveram redução significativa na taxa de consumo de glicose quando comparado aos animais do grupo controle. Por outro lado, os animais submetidos ao protocolo de treinamento de natação apresentaram aumento significativo nos valores da taxa de consumo de



glicose após 16h e 24h a última sessão de exercício, fato este não observado para os grupos treinados e avaliados após 36 e 48 horas do exercício no TTI, quando comparados ao grupo S-DHL. Além disso, os camundongos submetidos ao TTI após 36h e 48h da última sessão de exercício apresentaram uma taxa de consumo de glicose significativamente inferior do grupo controle e o grupo T-DHL 16h e 24h. Também foi notado que após 48 h o grupo T-DHL apresentou valores estatisticamente inferiores ao grupo T-DHL 16 horas. Os resultados para cada grupo foram: C,  $5.1 \pm 0.89$ ; S-DHL,  $1.86 \pm 0.56$ ; T-DHL16h,  $4.28 \pm 0.98$ ; T-DHL 24h,  $3.86 \pm 0.68$ ; T-DHL 36h,  $3.16 \pm 0.56$ ; T-DHL 48h,  $2.66 \pm 0.48$ , no TTI em % minuto.

Figura 1

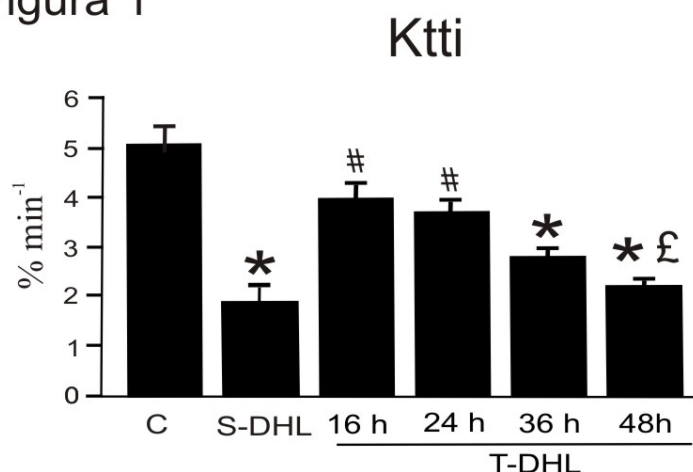


Figura 1. Teste de Tolerância à Insulina. \* $p < 0,05$ , camundongos controle (C) versus camundongos sedentários submetidos à dieta hiperlipídica (S-DHL), camundongos que treinaram e foram submetidos à dieta hiperlipídica 36h após última sessão de exercício (T-DHL 36h) e camundongos que treinaram e foram submetidos à dieta hiperlipídica 48h após última sessão de exercício (T-DHL 48h). # $p < 0,05$ , S-DHL versus camundongos que treinaram e foram submetidos à dieta hiperlipídica 16h após última sessão de exercício (T-DHL) 16h e camundongos que treinaram e foram submetidos à dieta hiperlipídica 24h após última sessão de exercício (T-DHL 24h). £ $p < 0,05$ , T-DHL 16h versus T-DHL 48h.

### Parâmetros fisiológicos e metabólicos

A figura 2, na forma de gráficos, são comparados os dados dos camundongos do grupo controle (C), com os camundongos sedentários que receberam a dieta hiperlipídica (S-DHL) e os camundongos que foram submetidos ao protocolo de treinamento e que receberam a dieta hiperlipídica (T-DHL). Quanto à massa corporal (C,  $34.0 \pm 3.86$ ; S-DHL,  $56.0 \pm 5.88$ ; T-DHL,  $45.0 \pm 4.62$  gramas - Figura 2A), gordura epididimal (C,  $0.9 \pm 0.32$ ; S-

DHL,  $3.4 \pm 0.62$ ; T-DHL,  $2.6 \pm 0.52$  gramas - Figura 2B), glicose de jejum (C,  $104.0 \pm 9.8$ ; S-DHL,  $335.0 \pm 12.88$ ; T-DHL,  $148 \pm 15.12$  mg/dl - Figura 2C) e insulina de jejum (C,  $2.2 \pm 0.54$ ; S-DHL,  $8.2 \pm 1.88$ ; T-DHL,  $4.32 \pm 2.12$  ng/ml - Figura 2D) nota-se que o grupo S-DHL teve aumento significativo em todos os parâmetros avaliados quando comparado aos grupos controle (C) e ao grupo T-DHL. Além disso, nota-se que o grupo T-DHL apresentou valores estatisticamente superiores para massa corporal, gordura epididimal e glicose de jejum quando comparado ao grupo controle (Figura 2A-2B-2C). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle e T-DHL para o parâmetro metabólico insulina (Figura 2D).

Ao comparar os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, pode-se verificar que o grupo submetido ao treinamento físico obteve melhora em todos os parâmetros. Ou seja, redução da massa corporal, gordura epididimal, glicemia de jejum e insulinemia de jejum (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D, respectivamente).

Figura 2

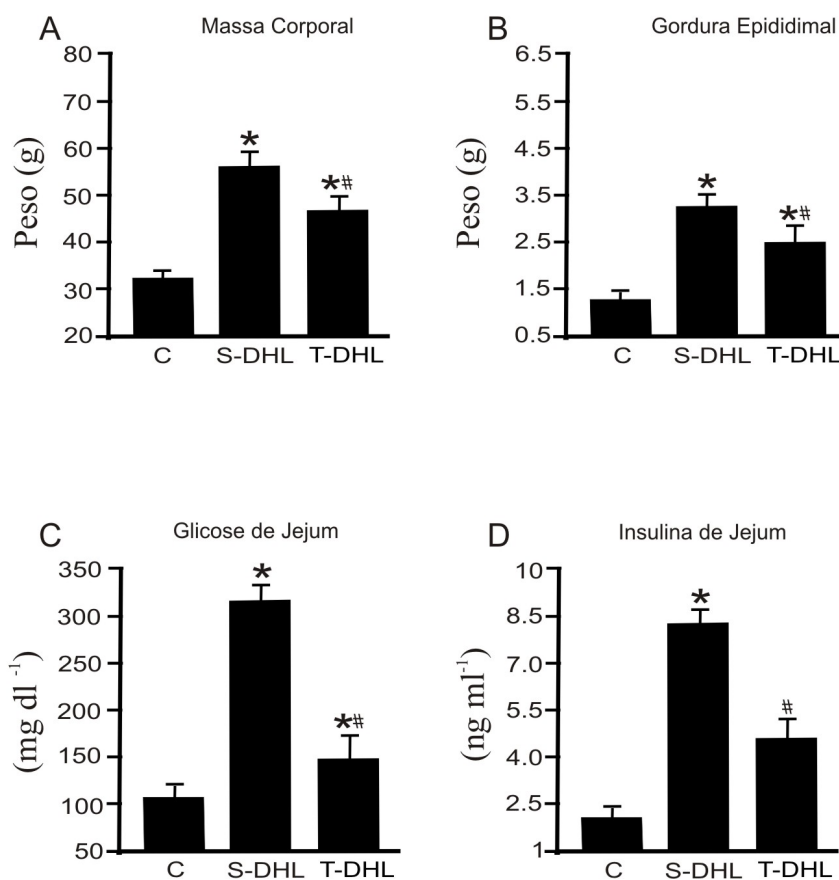


Figura 2. Parâmetros Fisiológicos e Metabólicos: Massa Corporal, Gordura Epididimal, Glicose de jejum e Insulina de jejum. \* $p < 0,05$ , camundongos controle (C) versus camundongos sedentários que receberam dieta hiperlipídica (S-DHL) e camundongos submetidos ao protocolo de treinamento e alimentados com dieta hiperlipídica (T-DHL). # $p < 0,05$ , S-DHL versus T-DHL.

### *O treinamento físico melhorou a atividade da Akt no fígado dos camundongos diabéticos*

Na figura 3A, esta representada a fosforilação da Akt induzida por salina e insulina entre os grupos estudados. Houve aumento na fosforilação da Akt nos camundongos controles que receberam injeção de insulina de 3.5 vezes quando comparado a seus pares com injeção de salina. Nos camundongos S-DHL, a fosforilação da Akt foi reduzida após injeção de insulina em 2.9 vezes, quando comparado com os camundongos controles. Nos animais T-DHL, a fosforilação da Akt aumentou em 2.6 vezes comparado aos animais S-DHL. Entretanto, não houve diferença na expressão da Akt entre os grupos estudados (figura 3A conteúdo abaixo do gráfico).

Quanto a proteína FoxO1 (Figura 3B), no grupo de camundongos controles injetados com insulina o aumento na fosforilação foi de 4.1 vezes em relação ao grupo controle salina. No grupo de animais S-DHL observou-se uma diminuição de 2.3 vezes da fosforilação da Foxo1 em comparação ao grupo controle, após a injeção de insulina. Porém, houve um aumento de 2.1 vezes da fosforilação da FoxO1 no grupo submetido ao treinamento físico em comparação ao grupo sedentário (ver figura 3B). Não houve diferença na expressão da proteína FoxO1 entre os grupos (Figura 3B), conteúdo abaixo do gráfico).

Figura 3

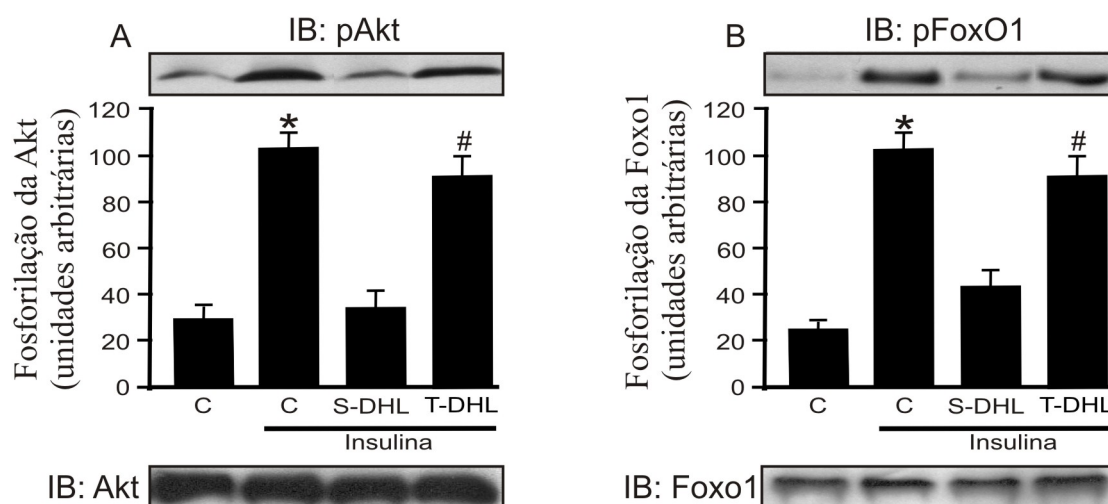


Figura 3. Sinalização da Insulina no tecido hepático. Após injeção de salina e de insulina nos camundongos os tecidos hepáticos foram retirados. A: Amostra de tecido foi imunoblutada (IB) com anticorpos anti-phospho Akt e anti-Akt. B: Amostra de tecido hepático foi imunoblutada (IB) com anticorpos anti-phospho FoxO1 e anti-Foxo1. \* $p < 0,05$ , camundongos controle que receberam injeção de salina (C) versus camundongos controle com injeção de insulina (C). # $p < 0,05$ , camundongos sedentários que receberam dieta hiperlipídica (S-DHL) versus camundongos submetidos ao protocolo de treinamento e alimentados com dieta hiperlipídica (T-DHL).

### *Treinamento físico suprimiu a expressão da TRB3 no tecido hepático dos camundongos*

Na figura 4A, pode-se observar um aumento de 2.9 vezes da expressão da proteína TRB3 em tecido hepático no grupo S-DHL em comparação ao grupo controle. Além disso, nota-se uma diminuição de 2.4

vezes da expressão da TRB3 em fígado no grupo T-DHL se compará-lo ao grupo S-DHL.

Quando se avalia a associação da TRB3 com a Akt no tecido hepático, pode-se observar que no grupo S-DHL houve um aumento de 3.2 vezes da associação entre a Akt com a TRB3, no fígado, quando comparado ao grupo controle. Já no grupo T-DHL, evidencia-se uma diminuição de 2.5 vezes na associação Akt/TRB3 em comparação ao grupo S-DHL (ver figura 4B).

Figura 4

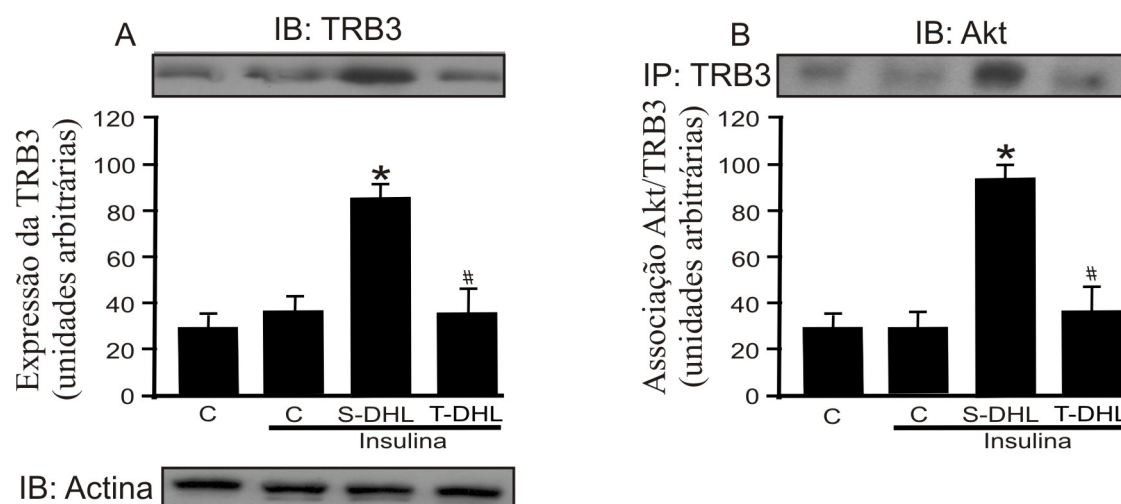


Figura 4. Expressão da TRB3 e associação Akt/TRB3. Após injeção de salina e de insulina nos camundongos as amostras do tecido hepático foram retiradas. A: Amostras foram imunoblotadas (IB) com anticorpo anti-TRB3. B: As amostras dos tecidos foram imunoprecipitadas (IP) com o anticorpo anti-TRB3 e imunoblotadas (IB) com anticorpo anti-Akt. \* $p < 0,05$ , camundongos controle (C) versus camundongos sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (S-DHL). # $p < 0,05$ , camundongos sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (S-DHL) versus camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico e alimentados com dieta hiperlipídica (T-DHL).

#### *O treinamento físico reduziu a expressão de PEPCCK e da G-6-Pase em fígado de camundongos diabéticos*

Ao observar o comportamento da expressão da enzima PEPCCK, verifica-se que houve um aumento de 3.3 vezes no grupo S-DHL em comparação ao grupo controle. Notou-se também que há uma diminuição de 1.6 vezes da expressão desta enzima no grupo T-DHL, quando comparados ao grupo DHL (ver figura 5A).

Já ao avaliarmos a expressão da enzima G-6-Pase, pode-se notar aumento de 3.6 vezes no grupo S-DHL, quando comparado ao grupo controle. Enquanto que, observou-se diminuição de 1.8 vezes de sua expressão no grupo T-DHL em comparação ao grupo S-DHL (figura 5B).

Figura 5

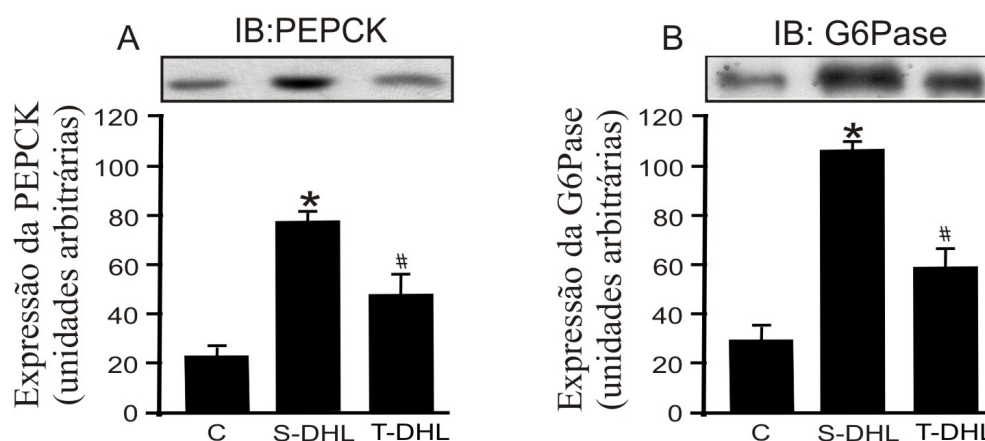


Figura 5. Expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-fosfatase (G-6-Pase). A: Amostras de tecido hepático foram imunoblottadas (IB) com anticorpo anti-PEPCK. B: As amostras de tecido hepático foram imunoblottadas (IB) com anticorpo anti-G-6-Pase. \* $p < 0,05$ , camundongos controle (C) versus camundongos sedentários submetidos à dieta hiperlipídica (S-DHL). # $p < 0,05$ , camundongos sedentários submetidos à dieta hiperlipídica (S-DHL) versus camundongos que realizaram o protocolo de treinamento físico e foram submetidos à dieta hiperlipídica (T-DHL).

## DISCUSSÃO

Com o passar dos anos, muitos componentes da via da sinalização da insulina foram descobertos e estudados, com o objetivo de especificar o papel intracelular de cada um deles na regulação da homeostase da glicose. Além disso, outros estudos têm demonstrado o mecanismo molecular da melhora da sensibilidade à insulina promovida pelo exercício físico em condições normais ou de doença, observando que esta adaptação está muito relacionada com o aumento da expressão e/ou da ativação de enzimas que regulam o metabolismo da glicose, com destaque a proteína Akt (ROPELLE et al, 2009; PAULI et al, 2008; LUCIANO et al, 2002). No entanto, a maioria desses estudos procurou investigar alterações decorrentes do exercício físico

no músculo esquelético, sem haver maior atenção quanto aos efeitos do exercício sobre o fígado. Por essa razão, em nosso estudo avaliamos o efeito do treinamento físico sobre a sinalização da insulina em tecido hepático de camundongos obesos.

Sabe-se, também, que a obesidade está associada a uma condição de resistência e prejuízo na sinalização intracelular da insulina. Um dos mecanismos moleculares para o desenvolvimento da resistência à insulina está envolvido com a redução da atividade da enzima Akt induzidas pela alta expressão da proteína TRB3. Estes eventos têm sido observados em diversos tecidos, principalmente no músculo e fígado (DU et al, 2003; MATSUSHIMA et al, 2006). Desse modo, a inibição da expressão de TRB3 pode ser um potencial alvo para melhora do quadro hiperglicêmico observado em muitos organismos obesos. Em acordo nossos resultados mostram que os animais submetidos à dieta rica em gordura também apresentaram redução na atividade da Akt e maior associação desta proteína com a TRB3, ratificando o efeito negativo da obesidade sobre a ação da insulina.

Nesse contexto, em nosso estudo foi possível demonstrar alguns aspectos relevantes que o treinamento físico promove para a melhora da sensibilidade à insulina, como: a redução da glicemia e da insulinemia de jejum; a diminuição da expressão da TRB3 e de sua associação com a Akt.

O exercício físico melhora a sensibilidade à insulina por conseguir estimular a expressão e a fosforilação de proteínas chaves na via da cascata da insulina. Ele promove aumento da fosforilação da Akt, permitindo melhora de suas funções. Uma das mais importantes ações da Akt aumentada é a translocação de transportadores de glicose para a membrana das células, (glut-2, no fígado e glut-4, no músculo esquelético e tecido adiposo) possibilitando maior captação de glicose e conseqüentemente, redução da glicemia. Em nosso estudo, observa-se que os animais submetidos ao protocolo de natação tiveram um aumento na atividade da Akt, confirmando tais pressupostos. Tal analogia pode ser feita com resultados encontrados por Pauli e colaboradores que mostraram que o treinamento físico de 1h por dia, cinco vezes por semana, durante oito semanas foi capaz de aumentar a expressão de glut-4 no músculo de ratos obesos (PAULI et al, 2009).

Outra característica importante na obesidade, resistência insulina e diabetes é o aumento da atividade das enzimas gliconeogênicas no fígado (PEPCK e a G-6-Pase), acarretando a hiperglicemia. A manutenção deste quadro hiperglicêmico pode trazer sérias conseqüências à saúde, como retinopatia, neuropatia periférica e autonômica, entre outras. Por esse motivo, o controle da glicemia deve ser uma das metas para prevenção da diabetes e co-morbididades associadas.

Recentemente foi demonstrado que a FoxO1 é uma importante proteína sinalizadora, que atuando diretamente no núcleo, modula a transcrição das enzimas gliconeogênicas previamente citadas. Sua ativação/desativação é mediada pela fosforilação da Akt (AOYAMA et al, 2006). Uma vez fosforilada, a FoxO1 é translocada para o citoplasma em resposta à ação da insulina e assim, reduz a transcrição dos genes da PEPCK e da G-6-Pase. No presente estudo foi possível observar altos níveis de PEPCK no fígado dos camundongos Swiss alimentados por dieta hiperlipídica, dado este que está de acordo com alguns estudos com camundongos que apresentavam severa resistência à insulina (MICHAEL et al, 2000; XU et al, 2003). Por outro lado, os ratos submetidos ao treinamento físico tiveram a fosforilação da FoxO1 aumentada e associado a isso houve também menor expressão da PEPCK e G-6-pase. Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura, como no estudo de Ropelle e colaboradores, que verificaram diminuição da expressão da PEPCK após uma sessão aguda de 2h de natação (ROPELLE, 2009).

Em síntese nossos resultados trazem novas considerações a respeito do treinamento físico sobre a sinalização da insulina no tecido hepático. Evidencia que o protocolo de natação utilizado provocou além da redução da massa corporal e da glicemia e insulinemia de jejum, redução significativa na expressão das proteínas gliconeogênicas, PEPCK e G-6-Pase, e com isso melhora da homeostase da glicose nos animais. Estas adaptações perduraram até 24 horas da última sessão do exercício. Em comparação ao estudo de Ropelle e colaboradores (2009) com um protocolo único de exercício, nosso estudo mostra que o treinamento físico é essencial para mudanças metabólicas em longo prazo como redução da massa corporal e concentração de glicose e insulina circulante.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados permitem sugerir que o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada pode ser uma ferramenta não farmacológica interessante para a prevenção e o tratamento da resistência à insulina e da diabetes tipo 2. Embora existam diferenças biológicas importantes entre roedores e humanos, os achados deste estudo mostram que os efeitos do exercício vão além dos convencionalmente documentados, e não restringe apenas ao músculo esquelético. Isso permite agora dizer que os efeitos positivos do exercício acontecem também no fígado.

Como demonstrado em nosso estudo o treinamento físico é capaz de modular proteínas responsáveis pela síntese de nova glicose, como a PEPCK e G-6-Pase, ambas com atividades aumentadas nos animais obesos. Tal descoberta traz novos conhecimentos a cerca dos benefícios do exercício físico na resistência à insulina e produção hepática de glicose.

Dentre os mecanismos regulados pelo exercício que promovem melhora significativa no processo de gliconeogênese temos a redução da expressão da proteína TRB3 e com isso, aumento da fosforilação e assim, atividade da Akt. Ativada, a Akt fosforila a proteína FoxO1 localizada no núcleo do hepatócito. Uma vez fosforilada, a FoxO1 migra-se ao citoplasma e inibe algumas proteínas gliconeogênicas (PEPCK e G-6-Pase). A redução da síntese de nova glicose permite uma melhora do quadro glicêmico dos camundongos diabéticos e conseqüentemente, dos efeitos deletérios da hiperglicemia.

Estes achados devem ser considerados, para que cada vez mais pessoas obesas e diabéticas sejam incentivadas a participar de programas de exercício físico regulares, tanto para prevenção, quanto tratamento da diabetes tipo 2, e retardamento da evolução da resistência à insulina, uma condição pré-diabética.

## REFERÊNCIAS

- ALTAMONTE, J., RICHTER, A., HARBARAN, S., et al. Inhibition of FoxO1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. **American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism**, 2003; 285(4): E718-28.
- AOYAMA, H., DAITOKU, H., FUKAMIZU, A. Nutrient control of phosphorylation and translocation of Foxo1 in C57BL/6 and db/db mice. **Int. J. Mol. Med.**, 2006; 18:433–439
- ASHMORE, J., HASTINGS, A.B., NESBETT, F.B. The effect of diabetes and fasting on liver glucose-6-phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1954; 40(8): 673-8.
- ATKINSON, M.A., EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, 2001; 358(9277): 221-229.
- BAND, C.J., POSNER, B.I. Phosphatidylinositol 3-kinase and p70s6k are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline (bpV(phen)) inhibition of insulin-like growth factor binding protein gene expression. Evidence for MEK-independent activation of mitogen-activated protein kinase by bpV(phen). **The Journal of Biological Chemistry**, 1997; 272(1): 138-45.
- BARTHEL A., SCHMOLL, D., KRÜGER, K.D., et. al. Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001; 285(4): 897-902.

BOUDEWIJN, M.T., MEDEMA, R.H. Decisions on life and death: FoxO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. **Journal Cell Biology**, 2003; 73(6): 689-701.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 1976; 72: 248–254.

BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M.J., et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, 1999; 96(6): 857-68.

CHEN, R., KIM, O., YANG, J., et al. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosin phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001; 276(34): 31858-62.

CLORE, J.N., STILLMAN, J., SUGERMAN, H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. **Diabetes**, 2000; 49(6): 969-74.

CORI, G.T., CORI, C.F. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage. **The Journal of Biological Chemistry**, 1952; 199(2):661-7.

DANIELE, N., RAJAS, F., PAYRASTRE, B., et al. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates onto liver endoplasmic reticulum and may account for the inhibition of glucose-6-phosphatase during refeeding. **The journal of Biological Chemistry**, 1999; 274(6): 3597-601.

DOWNWARD, J. Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Current Opinion in Cell Biology**, 1998; 10(2): 262-7.

- DU, K., HERZIG, S., et al. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. **Science**, 2003; 300(5625): 1574-7.
- FAYARD, E., TINTIGNAC, L.A., BAUDRY A., et al. Protein kinase B/Akt at glance. **Journal of Cell Science**, 2005; 118(Pt 24): 5675-8.
- HALL, R.K., YAMASAKI, T., KUCERA, T., et al. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 2000; 275(39): 30169-75.
- HANSON, R.W., GARBER, A.J. Phosphoenolpyruvate carboxykinase. Its role in gluconeogenesis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1972; 25(10): 1010-21.
- HOSSAIN, P., KAWAR, B., EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the development world: a growing challenge. **New England Journal Medicine**, 2007; 356(9): 213-215.
- LUCIANO, E., CARNEIRO, E.M., CARVALHO, C.R., et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur. J. Endocrinol**, 2002; 147:149-157.
- LYNEDJIAN, P.B. Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as an inhibitor of PKB-mediated insulin signalling in primary hepatocytes. **Biochemical Journal**, 2005; 386(Pt 1): 113-8.
- MATSUMOTO, M., HAN, S., KITAMURA, T., et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity

and lipid metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, 2006; 116(9): 2464-72.

MATSUSHIMA, R., HARADA, N., WEBSTER, N.J., et al. Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006; 281(40): 29719-29.

MICHAEL, L.F., ASAHARA, H., SHULMAN, A.L., et al. The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. **Mol. Cell Biol.**, 2000; 20:1596-1603.

MIYAKE, K., OGAWA, W., MATSUMOTO, M., et al. Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**, 2002; 110(10): 1483-91.

NAIKI, T., SAIJOU, E., MIYAOKA, Y., et al. TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting Akt and C/EBP beta. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007; 282(33): 24075-82.

NAKAE, J., KITAMURA, T., SILVER, D.L., et al. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. **The Journal of Clinical Investigation**, 2001; 108(9): 1359-67.

NAKASHIMA, K., YAKABE, Y., YAMAZAKI, M., et al. Effects of fasting and refeeding on expression of atrogin-1 and Akt/FoxO signaling pathway in skeletal muscle of chicks. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2006; 70(11): 2775-8.

NEVADO, C., VALVERDE, A.M., BENITO, M. Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes. **Endocrinology**, 2006; 147(8): 3709-18.

O'BRIEN, R.M., NOISIN, E.L., SUWANICHKUL, A., et al. Hepatic nuclear factor 3- and hormone-regulated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein 1 genes. **Molecular and Cellular Biology**, 1995; 15(3): 1747-58.

PAULI, J.R., ROPELLE, E.R., CINTRA, D.E., et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt in dietary induce obese Wistar rats. **Journal of Physiology**, 2008; 586(2): 659-71.

PAULI, J.R. ROPELLE, E.R. CINTRA, D.E., DE SOUZA, C.T. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2009; 15(2): 98-103.

PESSIN, J.E., SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, 2000; 106(2): 165-69.

PRUDENTE, S., HRIBAL, M.L., FLEX, E., et al. The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy. **Diabetes**, 2005; 54(9): 2807-11.

PUIGSERVER, P., RHEE, J., DONOVAN, J., et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. **Nature**, 2003; 423(6939): 550-5.

- ROGNSTAD, R. Glucose-6-phosphatase flux and the hepatic glucose balance model. **The American Journal of Physiology**, 1996; 271(6 Pt 1): E1125-7.
- ROPELLE, E.R., PAULI, J.R., CINTRA, D. E., et al. Acute exercise modulates the FoxO1/PGC-1 $\alpha$  pathway in the liver of diet-induced obesity rats. **J. Physiol.**, 2009; 587.9 pp 2069–2076.
- SHAO, J., QIAO, L., JANSSEN, R.C., et al. Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. **Diabetes**, 2005; 54(4): 976-84.
- SHE, P., SHIOTA, M., SHELTON, K.D., et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. **Molecular and cellular biology**, 2000; 20(17): 6508-17.
- SHE, P., BURGESS, S.C., SHIOTA, M., et al. Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. **Diabetes**, 2003; 52(7): 1649-54.
- SHEPHERD, P.R., WITHERS, D.J., SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **The Biochemical Journal**, 1998; 335(Pt 3): 711.
- SONG, G., OUYANG, G., BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2005; 9(1): 59-71.
- SUNG, H.Y., GUAN, H., CZIBULA, A., et al. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007; 282(25): 18379-87.

TANG, M., ZHONG, M., SHANG, Y., et al. Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway. **Cellular and molecular life**, 2008; 65(18): 2924-32.

TANIGUCHI, C.M., EMANUELLI, B., KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, 2006; 7(2): 85-96.

UEKI, K., YAMAMOTO-HONDA, R., KABURAGI, Y., et al. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, 1998; 273(9): 5315-22.

XU, H., BARNES, G.T., YANG, Q., et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, 2003; 112(12): 1821-1830.

ZIMMET, P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? **Journal of Internal Medicine**, 2000; 247(3): 301-10.